BIO-RAD

PASTOREX™ *CRYPTO* PLUS 61747

60 TESTS

DETECTION DES ANTIGENES SOLUBLES DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* DANS LES LIQUIDES BIOLOGIQUES (SERUM, L.C.R., L.B.A., URINE)

IVD

1- INTERET CLINIQUE

La cryptococcose est une infection opportuniste survenant chez les immunodéprimés et plus particulièrement au cours du SIDA où elle est aujourd'hui la principale cause d'infection fatale avec une fréquence variant de 2 à 10% en Europe occidentale et aux U.S.A., jusqu'à plus de 15% dans certaines régions d'Afrique (3). Chez ces patients immunodéprimés, la dissémination au système nerveux central (méningite) et aux autres organes est très rapide, à la suite d'une phase primaire pulmonaire (1). Les antigènes solubles sont rapidement décelables dans le sérum, dans le liquide céphalorachidien (L.C.R.), le liquide de lavage bronchio-alvéolaire (L.B.A.) et les urines.

Le diagnostic de la cryptococcose est fondé sur la détection microscopique de la levure capsulée, sur l'isolement de *Cryptococcus neoformans* en culture et sur la détection des antigènes capsulaires dans les liquides biologiques (2).

2- PRINCIPE

Pastorex™ *Crypto* Plus est un test qualitatif et semi-quantitatif qui permet, par une simple technique d'agglutination, de détecter le polysaccharide capsulaire de *Cryptococcus neoformans*, le glycuronoxylomannane (GXM), dans les liquides biologiques (sérums, L.C.R., L.B.A., urines).

Ce test met en oeuvre des particules de latex recouvertes d'un anticorps monoclonal anti-glycuronoxylomannane, composant majeur de la capsule de *Cryptococcus neoformans* (4). Une réaction entre les particules et le GXM se traduit par une agglutination visible à l'oeil nu. La limite de sensibilité est de 50 ng/ml, pour le sérum.

Le test peut être effectué sur des prélèvements inactivés 30 minutes à 56°C, dans le but d'éliminer le risque de contamination par le virus HIV.

Un traitement enzymatique préalable de tous les échantillons, excepté les urines, est nécessaire afin d'éliminer les interférences et d'augmenter la sensibilité de la détection (5-6-7)

Les échantillons positifs sont ensuite titrés par dilutions successives dans le tampon :

- Le titre antigénique donne une indication sur le stade et l'étendue de l'infection.
- Au cours de l'évolution, la détermination de la cinétique antigénique peut permettre d'évaluer l'efficacité thérapeutique (2).

3- PRESENTATION

Coffret de 60 tests - **code 61747** - contenant :

- **Latex *Cryptococcus* :** 1 flacon compte-gouttes de 1 ml de latex *Cryptococcus* : particules de latex rouge sensibilisées avec un anticorps monoclonal anti-glycuronoxylomannane (souris), en tampon glycine.
- **Positive control antigen :** 1 flacon compte-gouttes de 0,5 ml de témoin positif : polyoside capsulaire purifié à partir de *Cryptococcus neoformans*
- **Diluent buffer :** 1 flacon de 10 ml de tampon glycine albumine
- **Pronase :** 2 flacons d'enzyme lyophilisée (pronase) à reconstituer par 1 ml d'eau distillée ou déminéralisée.
- **Stopping solution :** 1 flacon compte-gouttes de 2 ml de solution d'arrêt (inhibiteur enzymatique).
- 15 cartes d'agglutination jetables
- 1 sachet de 100 bâtonnets jetables

Tous ces réactifs contiennent 0,02 % de merthiolate et une quantité < 0,1% d'azoture de sodium.

4- CONSERVATION

Les réactifs conservés à +2-8°C et en l'absence de contamination sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette (y compris après ouverture).

Une fois reconstituée la pronase peut-être conservée 4 semaines à +2-8°C ou plusieurs mois à -20°C

Conserver les réactifs latex verticalement.

NE JAMAIS CONGELER LES RÉACTIFS LATEX.

5- MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision
- Microtubes à bouchons hermétiques
- Agitateur rotatif horizontal (160 tours/minutes)
- Mixeur type "Vortex"
- Bain marie à 56°C.
- Bain marie à 100°C
- Bac désinfectant

6- PRECAUTIONS D'UTILISATION

La qualité des résultats dépend du respect des bonnes pratiques de laboratoire.

- Tous les réactifs ainsi que l'échantillon doivent être utilisés à une température comprise entre 18 et 30°C.
- Ne pas passer les doigts sur les surfaces réactionnelles d'agglutination.
- Changer de pipette ou de cône de prélèvement pour chaque échantillon testé.
- Agiter les flacons de latex avant utilisation.
- Essuyer l'embout compte-gouttes du réactif afin d'obtenir des gouttes bien calibrées.
- Tenir le flacon de latex verticalement lors du dépôt de la goutte.
- Changer de bâtonnet pour chaque réaction.
- Après usage, éliminer les pipettes de prélèvement des produits pathologiques ainsi que les cartes d'agglutination et les bâtonnets dans une poubelle autoclavable ou un bac désinfectant.

CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

Observer à tout moment les techniques et précautions en vigueur en matière de protection contre les dangers microbiologiques.

- Tous les prélèvements doivent être considérés comme potentiellement contagieux.
- Tous les réactifs latex contiennent de l'azoture de sodium. Eviter tout contact avec les yeux, la peau et les muqueuses.
- L'azoture de sodium peut réagir avec le plomb ou le cuivre présents dans les tuyaux d'évacuation et produire ainsi des azotures métalliques explosifs. Lors de leur élimination, rincer abondamment à grande eau pour éviter la formation de dépôts d'azoture.

7- MODE OPERATOIRE

1) PRÉPARATION DE L'ENZYME PRONASE

Reconstituer le flacon de pronase avec 1 ml d'eau fraîchement distillée ou déminéralisée. Eviter que la mousse ne se forme pendant la reconstitution et veiller à ce que tout le lyophilisat soit dissout.

Si 30 à 40 tests sont effectués chaque mois, conserver la pronase à +2-8°C (4 semaines de stabilité). Pour des séries inférieures, préparer des aliquots de 20 µl par tube et les conserver à -20°C.

2) ÉCHANTILLONS

- **Conservation**

Les échantillons devront être traités le plus rapidement possible après prélèvement. En cas d'impossibilité, on peut stocker le prélèvement quelques heures entre +2 et +8°C.

ATTENTION : n'utiliser que des prélèvements de sérum sur tube sec. Les interférences liées à une surcharge en albumine, lipides, hémoglobine et bilirubine n'ont pas été testées.

- **Traitement**

a) Sérum, L.B.A.

- Mettre 120 µl d'échantillon à tester dans un tube à bouchon hermétique, et ajouter 20 µl de pronase.
- Homogénéiser vigoureusement et chauffer à 56°C pendant 30 minutes.
- Enlever le tube du bain-marie et ajouter 1 goutte de solution d'arrêt (inhibiteur enzymatique).
- Homogénéiser.

ATTENTION : Lors du chauffage au bain-marie, éviter que l'eau ne pénètre dans les tubes, car ceci risquerait de fausser le résultat.

b) L.C.R.

- Dans le cas d'un L.C.R. très trouble ou présentant une contamination par des hématies, le centrifuger pendant 5 minutes à 350 g (2000 t/mn) et recueillir le surnageant.
- Mettre 120 µl d'échantillon à tester dans un tube à bouchon hermétique, et ajouter 20 µl de pronase.
- Homogénéiser vigoureusement et chauffer à 56°C pendant 30 minutes.
- Enlever le tube du bain-marie à 56°C.
- Arrêter l'activité enzymatique de la pronase par chauffage au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes.
- Homogénéiser.
- Laisser refroidir 3 à 4 minutes avant de réaliser l'agglutination.

ATTENTION : Lors du chauffage au bain-marie, éviter que l'eau ne pénètre dans les tubes, car ceci risquerait de fausser le résultat.

c) Urine

- Diluer au 1/2 dans le tampon de dilution.

3) RÉACTIONS D'AGGLUTINATION

- Déposer 40 µl d'échantillon traité sur un cercle de la carte d'agglutination.
- Déposer à côté une goutte de latex *Cryptococcus.*
- Mélanger à l'aide d'un bâtonnet.
- Réaliser un contrôle témoin négatif en mélangeant 40 µl de tampon de dilution avec une goutte de latex.
- Placer la carte d'agglutination sur l'agitateur pendant **5 minutes** (160 tours/minute), à température ambiante (+18-30°C).

8- INTERPRETATION DES RESULTATS

- **Lecture**

Une réaction positive se traduit par une agglutination des particules de latex avec l'échantillon testé et par une absence d'agglutination avec le témoin négatif (latex + tampon de dilution).

- **Titrage**

Le schéma des dilutions dans le tampon glycine peut être le suivant :

Dilution	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Echantillon traité :	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Tampon	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl

Un titrage précis sera ensuite réalisé par des dilutions successives de raison 2 à partir du dernier tube positif : 50 µl + 50 µl de tampon.

ATTENTION : l'interprétation des agglutinations aux fortes dilutions peut varier en fonction des utilisateurs; il est conseillé, lors du titrage d'un nouveau prélèvement du même malade, de confirmer le titre du prélèvement précédent.

9- CONTROLE QUALITE DU TEST

La sensibilité du latex peut être contrôlée périodiquement avec le témoin positif fourni dans le coffret dont la concentration en GXM est de 200 ng/ml.

10- CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

11- PERFORMANCES

L'anticorps monoclonal E1 utilisé dans ce test d'agglutination a été caractérisé par Dromer et al.(4).

Un test d'agglutination utilisant des particules de couleur blanche a précédemment été évalué confirmant les performances de cet anticorps. Une de ces études (8) réalisée sur 84 sérums de patients atteints de Cryptococcose et 47 sérums témoins a également permis de montrer que le traitement par la pronase améliorait la sensibilité et la spécificité de la détection du GXM.

Une autre évaluation (9) a montré que les titres antigéniques obtenus avec différents réactifs n'étaient pas identiques et que la négativation des antigènes solubles observée avec Pastorex™ *Crypto* Plus pourrait refléter l'efficacité thérapeutique.

Le passage à des particules de couleur rouge permet de mieux visualiser les agglutinats.

Au cours d'une évaluation clinique réalisée en laboratoire hospitalier, les résultats suivants ont été obtenus :

SENSIBILITÉ

Prélèvements issus de 38 patients atteints de Cryptococcose

Prélèvement		**Nombre de patients**	**Pastorex™ *Crypto* Plus**	
Type	Nbre total		+	-
SÉRUMS	28	21	26	2
L.C.R.	13	11	11	2
L.B.A.	1	1	1	0
URINE	9	5	9	0
TOTAL	51	38	47	4*

Sur ces 51 échantillons, la sensibilité globale de Pastorex™ *Crypto* Plus est estimée à 92%.

* Les 4 échantillons non détectés par le Pastorex™ *Crypto* Plus étaient également considérés négatifs par un autre test d'agglutination utilisant un anticorps polyclonal.

SPÉCIFICITÉ

Prélèvements issus de 92 patients témoins ne présentant pas de cryptococcose

Prélèvement		**Nombre de patients**	**Pastorex™ *Crypto* Plus**	
Type	Nbre total		+	-
SÉRUMS	62	62	2	60
L.C.R.	7	7	0	7
L.B.A.	21	19	0	21
URINE	6	4	0	6
TOTAL	96	92	2	94

Sur ces 96 échantillons, la spécificité globale de Pastorex™ *Crypto* Plus est estimée à 98%.

Des études internes complémentaires, portant sur 59 sérums dont 18 provenant de patients présentant une aspergillose ou une candidose prouvée ou suspectée, ont conduit à une spécificité de 100%.

La limite de détection de GXM en sérum est estimée à 50 ng/ml.

12- LIMITES DE LA METHODE

L'agglutination peut être inhibée par de très fortes concentrations en GXM (phénomène de zone). En cas de doute sur l'interprétation d'une réaction, il est conseillé de refaire le test sur une dilution au 1/100 de l'échantillon traité. Les résultats devront donc être interprétés en fonction de l'historique du patient.

Une concentration en antigène de l'échantillon inférieure au seuil de détection de Pastorex™ *Crypto* Plus conduit à un résultat négatif : dans ce cas, il est utile de répéter le prélèvement ultérieurement.

Les techniques de détection d'antigènes solubles par agglutination de particules de latex permettent une aide au diagnostic plus rapide que les techniques classiques de mise en culture. Les données cliniques et bibliographiques sur la détection de l'antigène (GXM) dans les L.B.A. et les urines avec les réactifs latex sont pour l'instant limitées.

Il a été décrit quelques similarités antigéniques entre la capsule de *Cryptococcus* et la paroi et de *Trichosporon beigelii* qui ont conduit à des réactions faussement positives chez les patients atteints de Trichosporose (4). Comme pour toute technique immunologique, on ne doit pas écarter la possibilité de réactions croisées.

Le diagnostic de la cryptococcose est fondé sur la détection microscopique de la levure capsulée, (coloration à l'encre de chine) sur l'isolement de *Cryptococcos neoformans* en culture et sur la détection des antigènes capsulaires dans les liquides biologiques (2).

Les techniques de détection d'antigènes solubles par agglutination de particules de latex permettent une aide au diagnostic.

Le diagnostic de cryptococcose ne peut être pris qu'après confrontation des arguments cliniques, radiologiques et biologiques (microbiologique, histologique, sérologique), chaque élément pris isolement devant être interprété avec circonspection.

13- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CAMERON M.L, BARTLETT J.A., GALLIS H.A., WASKIN H.A, Manifestations of Pulmonary Cryptococcocis in Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome, R.I.D., 1991, 13, p. 64-67
2. STAIB F., *Cryptococcocis* in Aids - Mycological-diagnostic and epidemiological observations, Aids-Forshung (AIFO), 1987, p. 363-382
3. DROMER F., MATHOULIN S., DUPONT B , LAPORTE A., and the French *Cryptococcosis* Study Group. Epidemiology of *Cryptococcosis* in France : A 9-Year Survey (1985-1993). Clin. Inf. Dis.1996, 23, p. 82-90
4. DROMER F., SALAMERO J., CONTREPOIS A., CARBON C., YENI P. Production, Characterization and Antibody Specificity of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide. Infect. and Immun., 1987, 55, p. 742-748
5. GRAY L.D., ROBERTS G.D. Experience with the Use of Pronase to eliminate Interference Factors in the Latex Agglutination Test for Cryptococcal Antigen. J. Clin. Microbiol., 1988, 26, p. 2450-2451
6. HEELAN J.S., CORPUS L , KESSIMIAN N. False-positive reaction in the Latex Agglutination Test for *Cryptococcus* neoformans Antigen. J.Clin. MIcrobiol. 1991, 29, p. 1260-1261

7. HAMILTON J.R., NOBLE A., DENNING D.W., STEVENS D.A. Performance of *Cryptococcus* Antigen Latex Agglutination Kits on Serum and Cerebrospinal Fluid Specimens of Aids patients before and after Pronase treatment. J. Clin. Microbiol. 1991, 29, p. 333-339
8. TEMSTET A., ROUX P., POIROT J.L., RONIN O., DROMER F. Evaluation of monoclonal antibody based latex test for the diagnosis of *Cryptococcosis* : Comparison with two tests Using Polyclonal Antibodies J. Clin. Microbiol. 1992, 30, p. 2544-2550.
9. SWINNE D., MEULEMANS L., DE VROEY Ch. Detection of *Cryptococcus* antigen with a mononucleal antibody based latex test (abstract) Trends in the management of systemic fungal infections, Nijmegen, The Netherlands, 5-7 Sept. 1991

CE
- CE marking (European directive 98/79/CE on in vitro diagnostic medical devices)
- Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro)
- Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro)
- EG Markierung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika)
- Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro)
- Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro)
- CE-märkning (Europa direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter lör in vitro-diagnostik)
- CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik)

IVD
- For *in vitro* diagnostic use
- Pour diagnostic *in vitro*
- Para diagnóstico *in vitro*
- *In vitro*-Diagnostikum
- Per uso diagnostico *in vitro*
- Para uso em diagnóstico *in vitro*
- *In vitro* diagnostik
- *In vitro* diagnose

REF
- Catalogue number
- Référence catalogue
- Número de catálogo
- Bestellnummer
- Numero di catalogo
- Número de catálogo
- Katalognummer
- Katalognummer

- Manufacturer
- Fabricant
- Fabricante
- Hersteller
- Produttore
- Fabricante
- Tillverkad av
- Fremstillet af

EC REP
- Authorised Representative
- Représentant agréé
- Representante autorizado
- Bevollmächtigter
- Distributore autorizzato
- Representante Autorizado
- Auktoriserad representant
- Autoriseret repræsentant

LOT
- Batch code
- Code du lot
- Código de lote
- Chargen-Bezeichnung
- Codice del lotto
- Código do lote
- Batch nr.
- Batchkoden

- Expiry date YYYY/MM/DD
- Date de peremption AAAA/MM/JJ
- Estable hasta AAAA/MM/DD
- Verwendbar bis JJJJ/MM/TT
- Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
- Data de expiração AAAA/MM/DD
- Utgångsdatum År/Månad/Dag
- Anvendes før ÅÅÅÅ/MM/DD

- Storage temperature limitation
- Limites de températures de stockage
- Temperatura limite
- Lagerungstemperatur
- Limiti di temperatura di conservazione
- Limites de temperatura de armazenamento
- Temperaturbegränsning
- Temperaturbegrænsning

- Consult Instruction for use
- Consulter le mode d'emploi
- Consulte la instrucción para el uso
- Siehe Gebrauchsanweisung
- Consultare le istruzioni per uso
- Consulte o folheto informativo
- Se instruktionsanvisning vid användning
- Se instruktion før brug

The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.

Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.

Los otros idiomas que se requiren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Bio-Rad.

Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.

Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.

As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.

Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.

De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.

Οι υπόλοιπες γλώσσες που απαιτούνται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία διατίθενται στον τοπικό αντιπρόσωπο Bio-Rad.

Bio-Rad
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00
Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33

12/2004
code: 880073